热休克蛋白 70 在牦牛胃中的分布和表达

杨晓晴　崔　燕*　何俊峰　杨　雪　刘鹏刚　廖　博　李　慧　孙　娟

（甘肃农业大学动物医学院，兰州 730070）

摘　要：本试验旨在研究牦牛热休克蛋白 70（HSP70）在牦牛胃中的分布特点和表达量的差异性变化。采集 8 头健康成年牦牛的胃组织，采用组织学染色方法研究皱胃腺体间细胞的类型；免疫组化法和蛋白质免疫印迹（WB）法分别检测 HSP70 在不同胃的分布及表达量。结果表明：嗜银染色及阿利新蓝-过碘酸-雪夫(AB-PAS)染色发现，皱胃腺体间含有大量的内分泌细胞。免疫组化检测发现，在牦牛瘤胃、网胃、瓣胃，HSP70 的阳性表达仅见于黏膜上皮细胞层，角质层细胞呈强阳性表达，而基底层、颗粒层和棘层的部分细胞呈中等阳性表达，部分未见阳性表达；皱胃阳性反应的范围较广，不仅黏膜表面上皮细胞有表达，胃腺间的内分泌细胞及壁细胞也呈阳性表达。且阳性反应主要集中在细胞的胞质和胞核。免疫组化和 WB 结果均表明，HSP70 在牦牛皱胃表达量最高，瘤胃、网胃及瓣胃依次递减，部位间差异极显著（$P<0.01$）。综合得出，牦牛皱胃腺体间含有大量嗜银性内分泌细胞，HSP 在所有胃中均有分布，且皱胃的表达量显著高于其他胃，提示 HSP70 可能与牦牛胃的消化吸收有一定的关联性。

关键词：热休克蛋白 70；胃；组织结构；牦牛

中图分类号：S823

热休克蛋白 70（heat shock protein,HSP70）是机体在不良因素刺激下产生的一类特殊应激蛋白，普遍存在于自然界生物体内，具有调节细胞增殖分化、抗凋亡、抗应激及参与免疫应答等多种重要生理功能[1-3]。近年来，HSP70 在胃肠道的研究为胃肠道疾病的治疗提供了重要的线索和依据，成为人们关注的热点。目前，国内外有关 HSP70 在胃中的研究主要集中于大鼠[4]、小鼠[5]、猪[6]及人[7]等单室胃动物，在反刍动物胃中的分布及表达量的尚不清楚。牦牛（*Bos grunniens*）[8]是生活在我国青藏高原地区的反刍动物，采食较为粗糙的牧草，这对胃黏膜损伤较大。研究发现，HSP70 作为胃肠黏膜细胞的分子伴侣，对胃肠黏膜细胞有

收稿日期：2017-12-19

基金项目：国家自然科学基金(31572478)

作者简介：杨晓晴（1990-），女，甘肃天水人，硕士研究生，从事动物组织学与胚胎学研究。E-mail: 1453685951@qq.com

*通信作者：崔　燕，女，教授，博士生导师，E-mail: cuiyan369@sina.com

重要的保护作用[9]。因此，本试验采用免疫组化及蛋白质免疫印迹（WB）法检测 HSP70 在牦牛各胃的分布特征及表达量的差异性变化，旨在进一步探究 HSP70 对牦牛胃的保护作用，为牦牛胃的新陈代谢及生理机能研究提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

2016 年 9 月从青海西宁屠宰场选择 8 头健康成年（3~5 岁）牦牛，雌雄各占 1/2，体重约为（600~900） kg。经颈动脉放血处死后，迅速剪切瘤胃、网胃、瓣胃及皱胃组织，去掉内容物后用无菌生理盐水冲洗干净。一部分组织样品浸于 4％的多聚甲醛磷酸盐缓冲液（pH 7.3）中，以备制作石蜡切片；另一部分组织样品快速放入液氮中，待后期移至-80 ℃保存，用于提取蛋白质。

1.2　试验方法

1.2.1　组织学检查及免疫组化法

将固定好的组织样品制成石蜡切片，切片厚度为 4 μm。用以下 3 种方法对其进行染色：1）嗜银染色(Gordon sweet)，观察并定位皱胃组织中的内分泌细胞。2）阿利新蓝-过碘酸-雪夫(Alcian blue-periodic acid-Schiff,AB-PAS)染色，进一步观察并定位皱胃组织中的分泌细胞。3）使用 HSP70 兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司)按 1:1 000 稀释后，进行免疫组化切片染色，具体方法参照 SP 试剂盒说明书进行。用磷酸盐缓冲液（PBS）（0.01 mol/L）代替一抗作阴性对照，苏木精复染，酒精梯度脱水，封片，用 Olympus-DP71 型光学显微系统观察其阳性反应并拍照。

1.2.2　WB 法检测 HSP 在牦牛各胃的表达量

将蛋白质样品调为同一浓度后，按各比例分别加入 4×十二烷基硫酸钠（SDS）的上样缓冲液，100 ℃水浴 10 min，使蛋白质变性后放入 4 ℃保存。待分离胶和浓缩胶制好后加样，每孔蛋白质样品上样量为 15 μL，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，当电泳至分离胶与浓缩胶交界处时更换电压，电压由原来的 80 V 切换为高压 150 V。电泳结束后，根据 Marker 条带切下目的蛋白所处的胶进行冰浴转膜至醋酸纤维素（PVDF）膜。将转膜后的 PVDF 膜放入 5%脱脂牛奶中，室温封闭 2.5 h。一抗 HSP70 兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司)用脱脂奶粉按 1:1 000 稀释，将封闭后的 PVDF 膜放入一抗 4 ℃孵育过夜。次日用吐温-磷酸盐缓

冲液（PBST）洗 10min，重复 3 次；将二抗羊抗兔免疫球蛋白 G（IgG）(bs-0295G-HRP，北京博奥森生物技术有限公司)用脱脂奶粉按 1:1 000 稀释后，PVDF 膜放入二抗孵育 1.5 h。ECL 曝光液(碧云天生物技术公司)（A 液、B 液体积比为 1:1 避光混匀）滴加在 PVDF 膜上，暗室显影 30 s 后用 X 光胶片曝光、显影、定影。胶片晾干后用扫描仪采集图片。用β-actin 做内参。通过 ImageJ 软件分析 WB 条带表达量。

1.3 数据分析

分别选取牦牛不同胃组织的 HSP70 免疫组化切片各 10 张，每张切片随机选取 10 个视野（1 000×），采用 Image-Pro plus 6.0 软件测定 HSP70 阳性反应物的积分光密度值。数据采用 SPSS 19.0 软件对各试验组数据进行单因素方差分析，试验数据用平均值±标准误(mean±SE)表示，$P<0.01$ 时判为差异极显著，$P>0.05$ 时判为差异不显著。

2 结 果

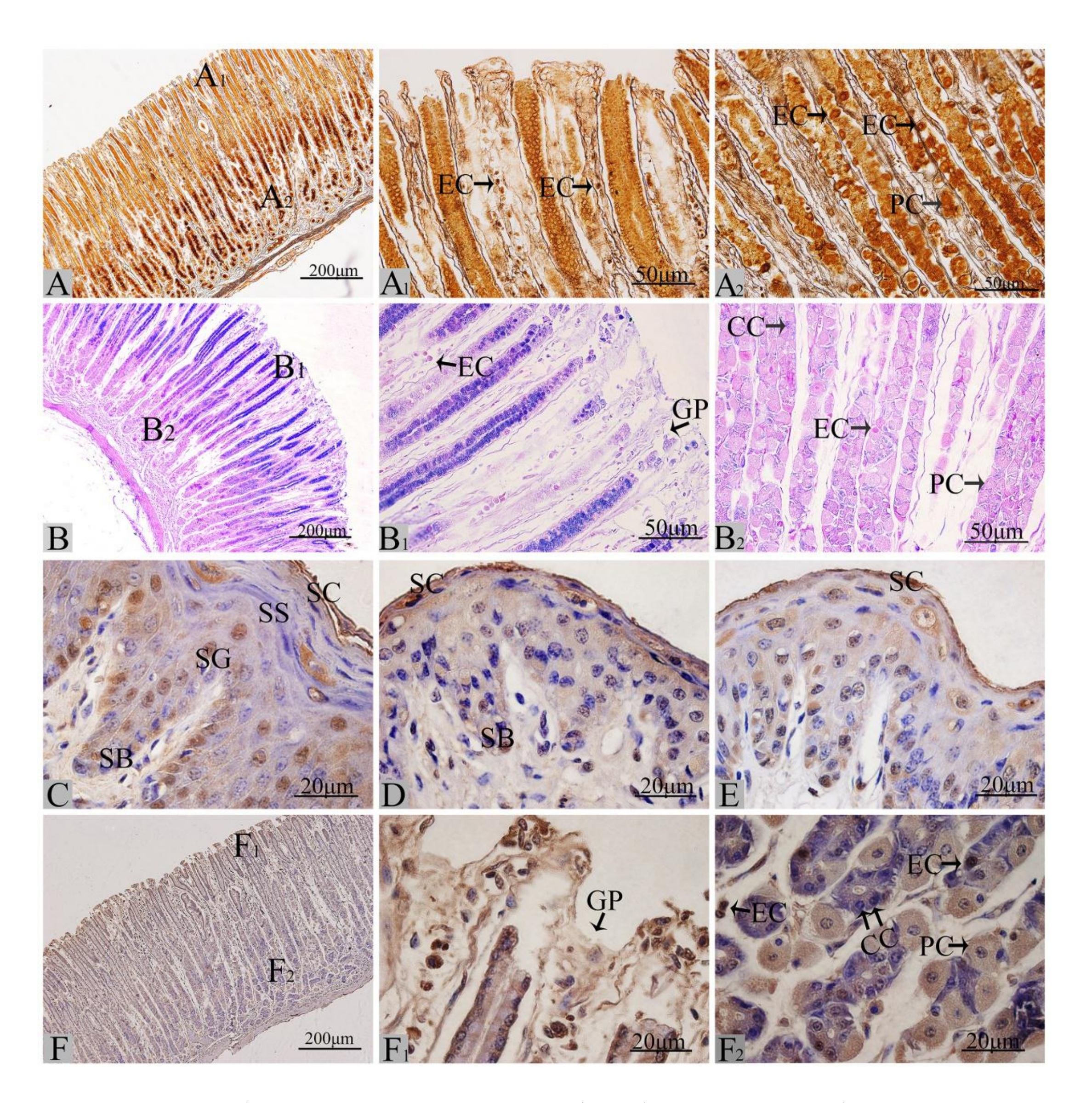
2.1 牦牛皱胃的组织学特点

嗜银染色结果表明，牦牛皱胃腺体间含有大量嗜银细胞分布，且这些嗜银细胞显色强弱不同，有一定的差异。内分泌细胞具较强的嗜银性，呈黑褐色，壁细胞嗜银性次之呈棕黄色，主细胞无嗜银性不着色（图 1-A）。

AB-PAS染色结果发现，皱胃腺体间的一些内分泌细胞呈深红色，壁细胞呈淡红色，主细胞呈蓝色（图1-B）。

2.2 HSP70 在牦牛各胃的分布

免疫组化结果显示，在牦牛瘤胃、网胃、瓣胃，HSP70 仅在黏膜上皮细胞层表达，呈棕黄色。其中，角质层细胞呈强阳性表达，基底层、颗粒层和棘细胞层的部分细胞呈中等阳性反应，部分细胞不表达（图 1-C、图 1-D、图 1-E）；不仅黏膜表面上皮细胞有表达，胃腺间的内分泌细胞及壁细胞也呈阳性表达（图 1-F）。阳性反应主要集中在细胞的胞质和胞核。积分光密度值分析发现，HSP70 在牦牛皱胃的阳性反应最强，瘤胃次之，网胃较低，瓣胃最低，各胃之间表达量的差异极显著（$P<0.01$）（表 1）。



A、A_1、A_2 分别为皱胃、皱胃胃小凹、皱胃腺体，嗜银染色；B、B_1、B_2 分别为皱胃、皱胃胃小凹、皱胃腺体，AB-PAS 染色；C、D、E 分别为瘤胃、网胃、瓣胃，免疫组化染色；F、F_1、F_2 分别为皱胃、皱胃胃小凹、皱胃腺体，免疫组化染色。EC:内分泌细胞；PC:壁细胞；GP:胃小凹；CC:主细胞；SC:角质层；SG:颗粒层；SS:棘层；SB:基底层。

A, A_1 and A_2 was the abomasum, the gastric pit of abomasum and the gland of abomasum, respectively, Gordon sweet staining; B, B_1 and B_2 was the abomasum, the gastric pit of abomasum and the gland of abomasum, respectively， AB-PAS staining; C, D and E was the rumen, the reticulum and the omasum, respectively, immunohistochemistry staining; F, F_1 and F_2 was the abomasums, the gastric pit of abomasum and the gland of abomasum, respectively， immunohistochemistry staining. EC: endocrine cell; PC: parietal cell; GP: gastric pit; CC: chief cell; SC: stratum corneum; SG: stratum granulosum; SS: stratums pinosum; SB: stratum basale.

图 1　牦牛胃的组织学与免疫组化检查

Fig.1 Histology and immunohistochemistry analysis of stomachs of yaks

表 1 HSP70 在牦牛胃的免疫组化积分光密度值

Table 1 Integrated optical density value of HSP70 in stomachs of yaks

项目 Items	积分光密度值 Integral optical density value
瘤胃 Rumen	2.134 7±0.001 1[b]
网胃 Reticulum	2.112 7±0.003 6[c]
瓣胃 Omasum	2.083 0±0.005 8[d]
皱胃 Abomasum	2.160 7±0.005 6[a]

同列数据肩标不同字母表示差异极显著(P<0.01)。下表同。

In the same column, values with different letter superscripts mean significant difference（P<0.01）. The same as below.

2.3 HSP70 在牦牛各胃的表达量

WB 检测结果显示，HSP70 在牦牛瘤胃、网胃、瓣胃和皱胃均有表达（图 2）。采用 ImageJ 软件分析发现，HSP70 表达量在牦牛各胃间差异极显著（P<0.01），皱胃最高,瘤胃次之,网胃较低,瓣胃最低（表 2）。

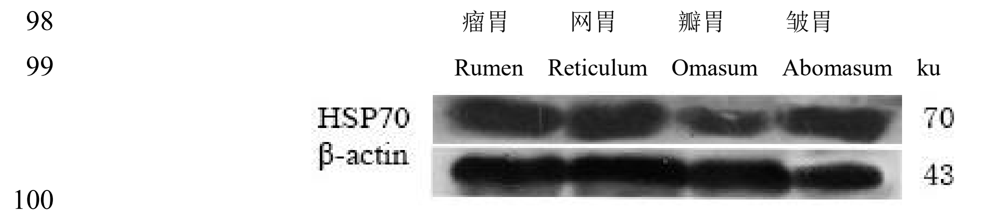


图 2 HSP 在牦牛胃的表达

Fig.2 Expression of HSP70 in stomachs of yaks

表 2 HSP 在牦牛胃的表达量

Table 2 Expression of HSP70 in stomachs of yaks

项目 Items	HSP70 表达量 Expression of HSP70
瘤胃 Rumen	3.440 1±0.022 1[b]
网胃 Reticulum	3.170 6±0.119 4[c]
瓣胃 Omasum	2.710 5±0.035 1[d]
皱胃 Abomasum	3.796 7±0.151 1[a]

3 讨 论

1987 年学者在犬胃黏膜首次发现了一类能被铬盐染色的细胞，随后研究发现这些细胞具有共同的特征，即在苏木精-伊红（HE）染色中很难辨认，而经嗜银染色后观察这些嗜银细胞呈黑褐色或棕黄色，反差较强极易辨认，学者推测此类细胞为内分泌细胞[10]。牦牛作为反刍动物，前胃（瘤胃、网胃、瓣胃）具有机械消化的作用，唯有皱胃腺体间含有大量的分泌细胞，具有真正消化意义的胃。因此，本试验采用嗜银染色，对牦牛皱胃腺体间细胞进行了鉴定，发现牦牛皱胃腺体间也存在有大量嗜银细胞。其中，内分泌细胞呈黑褐色，壁细胞呈棕黄色，而主细胞却无嗜银现象。这与双峰驼胃底腺的研究结果[11]相似。此外，该染色鉴别了牦牛皱胃腺体间的分泌细胞，为后期观察免疫组化阳性细胞类型奠定了基础。

牦牛采食较为粗糙的饲草，对前胃黏膜上皮有较强的刺激损伤作用，而胃肠黏膜上皮作为机体内增殖分化及凋亡最快的组织，细胞的损伤修复较快[12-13]。研究发现，在同一组织中，不同细胞发生增殖分化及凋亡的周期过程并不同步[14]。Alwajeeh 等[4]和 Omar 等[5]研究表明，HSP70 抑制鼠胃组织细胞的凋亡，对胃具有重要的保护作用。研究发现，正常生理条件下 HSP70 在人、小鼠、大鼠胃黏膜的表达量较低，当机体受到损伤刺激后，表达量呈显著升高[15-18]。本试验采用免疫组化法及 WB 法研究发现，在牦牛前胃，HSP70 在角质层呈强阳性反应，推测可能与抑制胃黏膜细胞过度凋亡、加速细胞修复和保护胃黏膜有关；HSP70 在基底层、颗粒层和棘细胞层的部分细胞中等阳性反应，部分细胞不表达。这种现象可能与细胞发生增殖分化及凋亡周期的过程不同步有关。更值得关注的是，本试验还发现，在牦牛前胃，HSP70 表达量在瘤胃最高,、网胃次之，瓣胃最低。牦牛瘤胃作为反刍动物第 1 胃，是抵抗食物刺激的第 1 道防线，黏膜角质化程度最高，损伤最大[19]。由此作者推测，HSP70 在牦牛前胃的表达量差异可能与胃黏膜的损伤程度有关。这与 Donnelly 等[15]、Silva 等[16]研究结果相似，即损伤刺激越严重，HSP70 表达量越高。

已有研究证实，胃内分泌细胞不仅自身具有分泌功能，还参与调控其他分泌细胞的分泌功能，它分泌的组胺对壁细胞分泌胃酸起着至关重要的调节作用，刺激胃酸的分泌[20-21]。Wada 等[22]研究发现，大鼠胃酸可以诱导胃黏膜热休克蛋白 72（HSP72）的表达，从而降低胃酸对胃黏膜的损伤。当胃内 pH 异常，酸碱平衡失调时，是导致胃溃疡的主要诱因，此时，胃可能通过自身机制诱导 HSP70 表达，用于维持胃内酸碱平衡，增强溃疡的愈合[23-24]。Arora

等[25]研究发现，在小鼠胃溃疡损伤时，内源性抗氧化酶升高及脂质过氧化导致 HSP70 上调，来保护胃黏膜。Marruchella 等[6]研究发现，HSP70 在猪食道黏膜上皮细胞表达，起到保护食道黏膜不受损伤的作用。本试验经免疫组化和 WB 结果发现，在牦牛皱胃，HSP70 不仅黏膜表面上皮细胞有表达，腺体间的内分泌细胞及壁细胞也呈阳性表达。作者推测，这可能与保护皱胃胃黏膜免受损伤及调控胃内分泌细胞及壁细胞的分泌功能有关，起到保护胃黏膜，调节胃内环境的酸碱平衡，促进食物消化吸收的作用；而 HSP70 表达量在皱胃显著高于前胃，结合免疫组化结果推测，这种高表达可能与 HSP70 在皱胃广泛的阳性分布有关。值得思考的是，本试验还发现，HSP70 在皱胃壁细胞中未见阳性反应，其原因有待进一步探索研究。

4 结 论

①牦牛皱胃腺体间含有大量分泌细胞。

②HSP70 在牦牛前胃角质层细胞呈强阳性反应，基底层、棘层及颗粒层部分细胞呈中等阳性表达，部分细胞不表达。

③皱胃阳性反应分布范围较广，不仅黏膜上皮细胞有表达，腺体间内分泌细胞及壁细胞也呈阳性反应。

④HSP 在牦牛 4 个胃均表达，其中皱胃表达量最高，瘤胃次之，网胃较低，瓣胃最低。

参考文献：

[1] GEHRMANN M,CERVELLO M,MONTALTO G,et al.Heat shock protein 70 serum levels differ significantly in patients with chronic hepatitis,liver cirrhosis,and hepatocellular Carcinoma[J].Frontiers in Immunology,2014,5:307.

[2] LARGE A T,GOLDBERG M D,LUND P A.Chaperones and protein folding in the archaea[J].Biochemical Society Transactions,2009,37(1):46–51.

[3] MUSTAFI S B,CHAKRABORTY P K,DEY R S,et al.Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS),p38MAPK,and Akt[J].Cell Stress and Chaperones,2009,14(6):579–589.

[4] ALWAJEEH N S,HAJEREZAIE M,NOOR S M,et al.The gastro protective effects of *Cibotium barometz* hair on ethanol-induced gastric ulcer in Sprague-Dawley rats[J].BMC

Veterinary Research,2017,13(1):27.

[5] OMAR H,NORDIN N,HASSANDARVISH P,et al.Methanol leaf extract of *Actinodaphne sesquipedalis* (Lauraceae) enhances gastric defense against ethanol-induced ulcer in rats[J].Drug Design,Development and Therapy,2017,11:1353–1365.

[6] MARRUCHELLA G,LEONARDO M D,GUARDO G D,et al.Heat shock proteins (HSPs) 27,72 and 73 in normal and pre-ulcerative mucosa of the gastric Pars Oesophagea in swine[J].Journal of Comparative Pathology,2004,131(1):10–17.

[7] DA SILVA M S,DE ALMEIDA A C A,DE FARIA F M,et al.*Abarema cochliacarpos*:gastroprotective and ulcer-healing activities[J].Journal of Ethnopharmacology,2010,132(1):134–142.

[8] JIANG M,CHEN Y,WANG Y,et al.Yak (*Bos grunniens*) stomach lysozyme:molecular cloning,expression and its antibacterial activities[J].Animal Biotechnology,2010,21(1):25–35.

[9] OHKAWARA T,NISHIHIRA J,TAKEDA H,et al.Protective effect of geranylgeranylacetone on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice[J].International Journal of Molecular Medicine,2006,17(2):229–234.

[10] 徐革锋,刘洋,牟振波.鱼类消化道内分泌细胞概述及研究方法[J].水产学杂志,2011,24(03):60-64,68.

[11] 王雯慧,陈怀涛.双峰驼胃底腺区黏膜组织学与组织化学研究[J].畜牧兽医学报,2003(04):372-377.

[12] ASSIMAKOPOULOS S F,SCOPA C D,ZERVOUDAKIS G,et al.Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia,intestinal oxidative stress,and apoptosis in experimental obstructive jaundice[J].Annals of Surgery,2005,241(1):159–167.

[13] LAINE L,TAKEUCHI K,TARNAWSKI A.Gastric mucosal defense and cytoprotection:bench to bedside[J].Gastroenterology,2008,135(1):41.

[14] 赵为红,寿好长,闫福岭.细胞凋亡[M].郑州:河南医科大学出版社,1998.

[15] DONNELLY B F,NEEDHAM P G,SNYDER A C,et al.Hsp70 and Hsp90 multichaperone

complexes sequentially regulate thiazide-sensitive cotransporter endoplasmic reticulum-associated degradation and biogenesis[J].Journal of Biological Chemistry,2013,288(18):13124–13135.

[16] SAIKA M,UEYAMA T,SENBA E.Expression of immediate early genes,HSP70,and COX-2 mRNAs in rat stomach following ethanol ingestion[J].Digestive Diseases and Sciences,2000,45(12):2455–2462.

[17] OTAKA M,ODASHIMA M,IZUMI Y,et al.Target molecules of molecular chaperone (HSP70 family) in injured gastric mucosa *in vivo*[J].Life Sciences,2009,84(19/20):664–667.

[18] 张绍敏,邹湉,付小义,陈出新.热休克蛋白 70 与慢性糜烂性胃炎胃黏膜损伤的相关性分析及其临床意义[J].国际消化病杂志,2016,36(05):291-294.

[19] 冯丹，欧阳佳良，王梦芝,等.饲粮中不同比例桑叶粉对湖羊瘤胃上皮组织结构的影响[J].动物营养学报,2017,29(6):2196–2203.

[20] DAS NEVES CARDOSO N,DA SILVEIRA FIRMIANO E M,GOMES I D,et al.Histochemical and immunohistochemical study on endocrine cells (5HT,GAS,and SST) of the gastrointestinal tract of a teleost,the characin *Astyanax bimaculatus*[J].Acta Histochemica,2015,117(7):595–604.

[21] LINDSTRÖM E,CHEN D,NORLÉN P,et al.Control of gastric acid secretion:the gastrin-ECL cell-parietal cell axis[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology,2001,128(3):503–511.

[22] WADA I,OTAKA M,JIN M,et al.Expression of HSP72 in the gastric mucosa is regulated by gastric acid in rats-correlation of HSP72 expression with mucosal protection[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2006,349(2):611–618.

[23] ISHIHARA T,SUEMASU S,ASANO T,et al.Stimulation of gastric ulcer healing by heat shock protein 70[J].Biochemical Pharmacology,2011,82(7):728–736.

[24] TSUKIMI Y,OKABE S.Recent advances in gastrointestinal pathophysiology:role of heat

shock proteins in mucosal defense and ulcer healing[J].Biological & Pharmaceutical Bulletin,2001,24(1):1–9.

[25] ARORA N,ALSAIED O,DAUER P,et al.Downregulation of Sp1 by Minnelide leads to decrease in HSP70 and decrease in tumor burden of gastric cancer[J].PLoS One,2017,12(2):e0171827.

Distribution and Expression of Heat Shock Protein 70 in Stomachs of Yaks

YANG Xiaoqing CUI Yan* HE Junfeng YANG Xue LIU Penggang LIAO Bo LI Hui SUN Juan

(College of Veterinary Medicine，Gansu Agricultural University，Lanzhou 730070，China)

Abstract: The purpose of this study was to study the distribution characteristics and differential changes of expression level of heat shock protein 70 (HSP70) in stomachs of yaks. The tissues of stomachs of 8 adult healthy yaks were collected， and the type of cells in the abomasal gland was studied by histological staining. The distribution and expression of HSP70 in different stomachs were detected by the methods of immunohistochemistry and Western blotting, respectively. The results showed as follows: Gordon sweet staining and Alcian blue-periodic acid-Schiff (AB-PAS) staining showed that a large number of endocrine cells were found in the abomasal gland. Immunohistochemistry analysis showed that in rumen, reticulum and omasum, HSP70 only positively expressed in the epithelial cell layer, strongly positively expressed in stratum corneum cells, some cells in basal layer, granular layer and spinous layer were moderately positive expressed， whereas some other cells were negatively expressed. The scope of the abomasum positive reaction was very wide, not only expressed in the epithelial cells of mucous surface, but also expressed in the endocrine cells and parietal cells in the abomasal gland. Meanwhile, the positive reaction was mainly concentrated in the cytoplasm and nucleus. Immunohistochemistry and Western blotting results both showed that the highest expression of HSP70 was found in the abomasal gland of yaks, the expression in rumen, reticulum and omasum was descended in order, and the differences among parts were significant ($P<0.01$). In conclusion, a large number of argyrophilia endocrine cells are found in the abomasal gland of yaks. HSP70 is distributed in all

stomachs of yaks, and the expression of the abomasum is obviously higher than that of other stomachs, which suggests that HSP70 may be associated with digestion and absorption of yaks' stomach.

Key words: heat shock protein 70; stomach; tissue structure; yak